



Kakao bubuk



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Syarat mutu	1
5 Pengambilan contoh	2
6 Cara uji	2
7 Syarat lulus uji	3
8 Higiene.....	3
9 Pengemasan.....	3
10 Syarat penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara uji kakao bubuk.....	4
Bibliografi	36
Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer <i>Butterfield's Phosphate Buffered Dilution Water</i> (BPB).....	21
Tabel A.1 - Reaksi biokimia <i>E. coli</i> pada uji IMVIC.....	25
Tabel A.2 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung	26
untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/mL contoh	26
Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk <i>Salmonella</i> sp.	33
Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non <i>Salmonella</i> sp.	34

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Kakao bubuk* ini merupakan revisi dari SNI 3747:2009, *Kakao bubuk*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku.
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan produk pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Diversifikasi produk/pengembangan produk;
- Mendukung perkembangan industri kakao;

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada :

1. Undang-undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
4. Undang-undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Kesehatan No. 722/MENKES/PER/IX/1988, tentang Bahan Tambahan Makanan atau revisinya.
8. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*)
9. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
10. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67 – 04, Makanan dan Minuman, yang telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 24 November 2011 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawasan Obat dan Makanan dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 22 Maret 2012 sampai 21 Mei 2012 dengan hasil akhir RASNI.

Kakao bubuk

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji kakao bubuk.

2 Acuan normatif

Untuk acuan tidak bertanggal berlaku edisi terakhir (termasuk revisi dan atau amandemen)

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

kakao bubuk

produk yang diperoleh dari bungkil kakao yang diubah bentuknya menjadi bubuk

3.2

bungkil kakao (*cocoa cake*)

produk kakao yang diperoleh dari pemisahan sebagian lemak dari keping biji kakao atau kakao massa

3.3

kakao massa

produk berupa pasta yang diperoleh dari keping biji kakao melalui penggilingan tanpa menghilangkan kandungan lemaknya

3.4

keping biji kakao (*cocoa nibs*)

biji tanaman kakao yang telah dihilangkan kulitnya

4 Syarat mutu

Syarat mutu kakao bubuk sesuai dengan Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu kakao bubuk

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	normal
1.2	Rasa	-	normal
1.3	Warna	-	normal
2	Kehalusan (lolos ayakan mesh 200)	% (b/b)	min. 99,5

Tabel 1 (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
3	Kulit (<i>shell</i>) dihitung dari bahan kering bebas lemak	%(b/b)	maks. 1,75
4	Kadar air	% (b/b)	maks. 5,0
5	Kadar lemak	% (b/b)	min. 10,0
6	Cemaran logam		
6.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 1,0
6.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 1,0
6.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0
6.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
7	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 1,0
8	Cemaran mikroba		
8.1	Angka Lempeng Total	koloni/g	maks. 5×10^3
8.2	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3
8.3	Salmonella	-	Negatif/25 g
8.4	Kapang	koloni/g	maks. 50
8.5	Khamir	koloni/g	maks. 50

5 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai SNI 0428.

6 Cara uji

Cara uji untuk kakao bubuk seperti di bawah ini.

- a) Persiapan contoh uji sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3
- c) Cara uji kehalusan sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji kulit (*shell*) dihitung dari bahan kering bebas lemak (b/b) sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.5
- f) Cara uji kadar lemak sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.7
 - Cara uji timbal (Pb), kadmium (Cd) sesuai Lampiran A.7.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.7.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.7.3

- h) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.8
- i) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.9
 - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.9.2
 - Cara uji *E.coli* sesuai Lampiran A.9.3
 - Cara uji *Salmonella* sp. sesuai Lampiran A.9.4
 - Cara uji Kapang dan Khamir sesuai Lampiran A.9.5

7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu.

8 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

9 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

10 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan peraturan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.

Lampiran A
(normatif)
Cara uji kakao bubuk

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh kakao bubuk dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh kakao bubuk dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh kakao bubuk dan ambil contoh sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan**A.2.1 Bau****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering,
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya, dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tercium bau khas kakao bubuk, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium selain bau khas kakao bubuk, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Rasa**A.2.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indra pengecap (lidah), dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terasa khas kakao bubuk, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika terasa selain rasa khas kakao bubuk, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.3 Warna**A.2.3.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering,
- b) amati contoh uji untuk mengetahui warnanya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terlihat warna coklat hingga hitam, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika terlihat selain warna coklat hingga hitam, maka hasil dinyatakan warna sesuai dengan yang diamati.

A.3 Kehalusan**A.3.1 Prinsip**

Pengukuran derajat kehalusan dari contoh menggunakan ayakan mesh 200.

A.3.2 Peralatan

- a. gelas piala;
- b. batang pengaduk;
- c. ayakan (mesh 200);
- d. Erlenmeyer sedot;
- e. Kertas saring Whatman 41;
- f. neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg
- g. oven 103 °C -105 °C;
- h. botol pencuci;

A.3.3 Pereaksi

- a. Aseton p.a

A.3.4 Cara kerja

- a) Timbang kira-kira 5 g contoh ke dalam gelas piala. Tambahkan 20 mL air suling panas dan aduk dengan batang pengaduk secara hati-hati sampai tidak terdapat gumpalan

- lagi, kemudian, tambahkan 280 mL air suling panas (75 ± 5) °C dan aduk dengan kuat selama 2 menit dengan menggunakan pengaduk mekanik.
- tuangkan suspensi ke dalam ayakan (mesh 200) goyangkan. Bilas gelas piala dan penyaring dengan 1,5 L air suling panas (75 ± 5) °C. Apabila suspensi sulit lolos, tepuk penyaring secara perlahan-lahan sampai tidak ada lagi partikel yang lolos.
 - pindahkan suspensi ke dalam kertas saring;
 - bilas saringan dan residu dengan 15 mL sampai 25 mL aseton untuk menghilangkan residu air dan lemak.
 - pindahkan saringan ke dalam kaca arloji dan keringkan selama 45 menit pada suhu $103 \text{ }^{\circ}\text{C} - 105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ dinginkan dalam desikator selama 20 menit – 30 menit.
 - timbang kertas saring, residu, dan kaca arloji.

A.3.5 Perhitungan

$$\text{Kadar residu (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100 \%$$

$$\text{Kehalusan (\%)} = 100 \% - \text{kadar residu}$$

Keterangan:

m_1 adalah bobot kertas saring, residu kering dan kaca arloji (g);
 m_2 adalah kertas saring dan kaca arloji (g);
 m_0 adalah bobot contoh, (g);

A.4 Kandungan Kulit (berdasarkan bahan kering bebas lemak)

A.4.1 Prinsip

Destruksi senyawa organik yang terdapat didalam contoh uji tanpa mendestruksi sel-sel keras (*stone cells*) kemudian disuspensikan dalam gliserol. Jumlah kelompok sel-sel keras dan jumlah sel keras dalam tiap kelompok diamati dan dihitung dengan menggunakan mikroskop. Kandungan kulit dihitung dengan cara penetapan empirik kurva kalibrasi yang menyatakan hubungan antara banyaknya kelompok sel keras dan ukuran rata-rata kelompok contoh uji dengan kandungan kulit 1% yang diukur dalam bahan kering bebas lemak.

A.4.2 Peralatan

- Mikroskop;
- counting grid* berukuran $\pm (33 \times 33 \times 0,2)$ mm;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- sentrifuse;
- oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- penangas air;
- tabung kultur;
- tabung kaca berujung lancip, diameter dasar ± 5 mm, diameter atas 1 mm, dan panjang 150 mm;
- kaca objek berukuran $\pm (75 \times 38 \times 0,5)$ mm; dan
- gelas piala.

A.4.3 Pereaksi

- Pereaksi Bellucci;
(asam asetat glasial : HNO_3 pekat : air suling = 36 : 5 : 9)
- gliserol; dan
- eter.

A.4.4 Cara kerja

A.4.4.1 Menghilangkan lemak

- Timbang 15 g kakao bubuk ke dalam tabung sentrifuse 250 mL,
- tambahkan 100 mL eter untuk ekstraksi lemak,
- tutup tabung dan kocok hingga lemak larut dalam eter kemudian saring,
- larutan yang melewati saringan ditampung dalam tabung sentrifuse 500 mL,
- cuci bahan yang ada diatas saringan dengan eter, dan biarkan kira-kira 15 menit hingga kering,
- bilas peralatan mortar dan corong dengan eter. Hasil bilasannya dimasukkan ke dalam tabung sentrifuse 500 mL,
- tutup botol sentrifuse dan kocok hingga lemak larut,
- buka tutup tabung dan bilas dengan eter,
- sentrifuse selama 10 menit pada 2 000 rpm dan supernatan dibuang,
- tambahkan 100 mL eter untuk ekstraksi kembali dan lakukan sesuai dengan A.3.4.1.m,
- tambahkan 100 mL eter, tabung ditutup, dan kocok,
- segera tuangkan ke dalam labu *rotary evaporator* dan bilas tabung sentrifuse dengan eter 35 mL,
- lakukan evaporasi eter selama lebih kurang 20 menit hingga kering,
- pindahkan seluruh residu ke dalam mortar menggunakan sudip atau sendok yang bersih dan kering kemudian gerus hingga halus,
- setelah halus, pindahkan kembali ke piringan alumunium atau porselin dan keringkan selama 10 menit sampai dengan 15 menit dalam penangas air untuk menghilangkan sisa eter, dan
- keringkan dalam oven pada suhu 100 °C selama 1 jam sehingga diperoleh kakao bubuk kering bebas lemak.

A.4.4.2 Menghitung kandungan kulit

- Timbang dengan teliti 0,500 g (W) kakao bubuk kering bebas lemak ke dalam gelas piala 150 mL,
- tambahkan 20 mL pereaksi Bellucci secara perlahan dan sambil diaduk,
- bilas dinding gelas piala dengan sisa pereaksi Bellucci apabila ada kakao bubuk yang menempel,
- didihkan selama 10 menit sambil sesekali diaduk kemudian dinginkan selama ± 5 menit,
- timbang tabung kultur yang berada di dalam gelas piala 30 mL yang berfungsi sebagai penyangga,
- pindahkan residu secara hati-hati ke dalam tabung kultur dengan sedikit penambahan air dan sentrifuse pada kecepatan penuh selama lebih kurang 3 menit,
- buang cairan supernatan, tambahkan air suling hingga $\frac{3}{4}$ volume tabung, tutup tabung dan kocok sampai residunya terdispersi dalam larutan kemudian sentrifuse kembali pada kecepatan penuh selama lebih kurang 3 menit,
- buang kembali supernatan-nya dan tambahkan larutan gliserol (gliserol : air = 3 : 2) hingga isi tabung dan penyangganya berbobot $(20 \pm 0,03)$ g (L),
- kocok dengan kuat sampai benar-benar tercampur dan pindahkan ke botol berisi batang magnet kecil, tutup dan biarkan botol selama 5 menit sampai 10 menit hingga gelembungnya hilang,
- timbang secara bersamaan *slide* kaca berskala dan tutupnya,
- aduk larutan dalam botol menggunakan pengaduk magnet selama 1 menit pada kecepatan maksimum hingga tidak terbentuk gelembung,
- pindahkan tetesan larutan dengan menggunakan sendok $(0,04 \pm 0,01)$ g (D) ke bagian tengah *slide* kaca, tempatkan penutupnya diatas *slide* sehingga larutan akan bergerak ke pinggir *slide*, jangan sampai menekan penutupnya,
- timbang *slide* hingga 0,1 mg,

- n) tutup botol dengan penutup karet untuk mencegah evaporasi,
- o) tempatkan *slide* pada mikroskop dan hitung *stone cell* dengan cara *scan slide* 100 x dan hitung *stone cell* pada $\geq 200x$,
- p) hitung seluruh *stone cell* baik yang menyendiri maupun berkelompok, ataupun yang sudah rusak dengan ukuran sel $\geq 0,5$ (C) , jangan menghitung fragmen kecil,
- q) lakukan pengamatan dengan mikroskop sebanyak dua kali untuk setiap pekerjaan.

A.4.5 Perhitungan

$$\text{Bobot kakao bubuk dalam tetesan larutan (M) (mg)} = 1000 \frac{WD}{L}$$

$$\text{Kandungan kulit (S) (\%)} = \frac{84C}{17200M - C}$$

Keterangan:

- W adalah bobot kakao bubuk kering bebas lemak, dinyatakan dalam gram (g);
- L adalah bobot larutan kakao bubuk kering bebas lemak, dinyatakan dalam gram (g);
- D adalah bobot tetesan larutan yang dihitung, dinyatakan dalam gram (g);
- M adalah bobot kakao bubuk kering bebas lemak dalam tetesan larutan, dinyatakan dalam miligram (mg);
- C adalah jumlah *stone cell* dalam tetesan cairan; dan
- S adalah kandungan kulit, dinyatakan dalam persen (%);

A.5 Kadar air

A.5.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(100 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

A.5.2 Peralatan

- a) Oven terkalibrasi;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Desikator yang berisi desikan; dan
- d) Pinggan aluminium bertutup dengan diameter 50 mm dan tinggi/kedalaman kurang dari atau sama dengan 40 mm.

A.5.3 Cara kerja

- a) Panaskan pinggan aluminium beserta tutupnya dalam oven pada suhu $(100 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama 1 jam, kemudian dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (pinggan dan tutupnya) (W_0);
- b) masukkan 2 g contoh ke dalam pinggan, tutup, dan timbang (W_1);
- c) panaskan pinggan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup pinggan disamping pinggan di dalam oven pada suhu $(100 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama 2 sampai dengan 4 jam setelah suhu oven $(100 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- d) tutup pinggan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit, sehingga suhunya sama dengan suhu ruang, kemudian timbang (W_2);
- e) lakukan pekerjaan duplo; dan
- f) hitung kadar air dalam contoh.

A.5.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot pinggan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g)

A.5.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka uji harus diulang kembali.

A.6 Kadar lemak

A.6.1 Prinsip

Hidrolisis lemak dalam contoh menggunakan HCl kemudian diekstraksi dengan petroleum eter. Ekstrak petroleum eter yang diperoleh kemudian diuapkan sampai kering dan kadar lemak dihitung secara gravimetri.

A.6.2 Peralatan

- Alat Soxhlet lengkap;
- Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas air;
- Thimble ekstraksi atau selongsong kertas saring ukuran (33 x 80) mm;
- Desikator yang berisi desikan;
- Labu lemak 250 mL;
- Gelas piala 500 mL atau 300 mL;
- Kaca arloji; dan
- Kertas saring bebas lemak.

A.6.3 Pereaksi

- Larutan asam klorida (HCl) 8 M;
- Petroleum eter atau heksan;
- Larutan perak nitrat (AgNO_3) 0,1 M;
larutkan $(17,0 \pm 0,1)$ g (AgNO_3) p.a. di dalam 1 000 mL air suling.
- Air suling; dan
- Batu didih.

A.6.4 Cara kerja

A.6.4.1 Hidrolisis

- Timbang 4 g sampai dengan 5 g contoh (m) yang telah dipersiapkan dengan teliti ke dalam gelas piala 300 mL atau 500 mL;
- tambahkan 45 mL air suling mendidih dengan perlahan sambil diaduk hingga homogen;

- c) tambahkan 55 mL HCl 8 M (2 bagian HCl ditambah 1 bagian air) dan beberapa butir batu didih;
- d) tutup gelas piala tersebut dengan kaca arloji lalu didihkan perlahan-lahan selama 15 menit;
- e) bilas kaca arloji dengan air suling dan masukkan air pembilas tersebut ke dalam gelas piala;
- f) saring endapan menggunakan kertas saring bebas lemak;
- g) bilas gelas piala 3 kali dengan air suling, lakukan pencucian hingga bebas klor yang dapat ditentukan dengan penambahan 1 tetes sampai dengan 3 tetes AgNO_3 0,1 M pada filtrat, jika tidak terdapat endapan putih (AgCl) maka telah bebas klor; dan
- h) pindahkan kertas saring serta isinya ke dalam *thimble* ekstraksi atau selongsong kertas saring bebas lemak dan keringkan 6 jam pada suhu 100 °C sampai dengan 101 °C.

A.6.4.2 Ekstraksi

- a) Keringkan labu lemak yang berisi beberapa butir batu didih selama 1 jam;
- b) dinginkan dalam desikator dan timbang (W_0), sambungkan dengan alat ekstraksi *Soxhlet*;
- c) masukkan *thimble* ekstraksi atau selongsong kertas saring ke dalam *Soxhlet* (sebaiknya *thimble* ditopang *glass bead*), bilas piala yang digunakan untuk hidrolisis dan yang digunakan waktu pengeringan dengan petroleum eter atau heksan sebanyak 3 x 5 mL, tuangkan ke dalam *Soxhlet*, kemudian tuangkan petroleum eter sebanyak 2/3 kapasitas labu di atas penangas;
- d) ekstrak selama 4 jam dengan kecepatan ekstraksi lebih dari 30 kali;
- e) keringkan labu lemak beserta lemak di dalam oven pada suhu 100 °C sampai dengan 101 °C selama 1,5 jam sampai dengan 2 jam;
- f) dinginkan dalam desikator dan timbang (W_1); dan
- g) ulangi pengeringan sampai perbedaan penimbangan bobot lemak yang dilakukan berturut-turut kurang dari 0,05 %.

A.6.5 Perhitungan

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{m} \times 100 \%$$

Keterangan:

- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- W_0 adalah bobot labu lemak kosong, dinyatakan dalam gram (g);
- W_1 adalah bobot labu lemak kosong dan lemak, dinyatakan dalam gram (g).

A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil lemak. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka uji harus diulang kembali.

A.7 Cemaran logam

A.7.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.7.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat

Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb.

A.7.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur 10 mL;
- Gelas piala 250 mL;
- Botol polipropilen;
- Cawan porselen/platina/kwarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi retensi partikel 20 µm sampai dengan 25 µm.

A.7.1.3 Perekasi

- Asam nitrat, HNO₃ pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan asam nitrat, HNO₃ 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO₃ pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl pekat dengan akuabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 000 µg/mL Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 µg/mL siap pakai.
- Larutan baku 200 µg/mL Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/mL Cd.
- Larutan baku 20 µg/mL Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/mL Cd.
- Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,8 µg/mL; 1,4 µg/mL dan 1,8 µg/mL Cd.
- Larutan baku 1 000 µg/mL Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 µg/mL siap pakai.

- j). Larutan baku 50 µg/mL Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 µg/mL Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/mL.
- k). Larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL dan 2,0 µg/mL PA.

A.7.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur (450 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO₃ pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu (450 ± 5) °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO₃ 0,1 N 20 mL – 30 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan akuabides (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j). plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k). hitung kandungan logam dalam contoh

A.7.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);
V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.7.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

A.7.2 Timah (Sn)

A.7.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan spektrofotometer serangan atom pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.7.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas listrik;
- Penangas air;
- Pipet ukur berskala 0,1 mL kapasitas 5 mL dan 10 mL terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 mL;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL, dan 1000 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur kapasitas 50 mL; dan
- Gelas piala 250 mL.

A.7.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium, 10 mg/mL K; larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL;
- Asam nitrat pekat, HNO_3 pekat;
- Asam klorida pekat, HCl pekat;
- Larutan baku 1 000 mg/L Sn; dan larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL asam HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutkan baku kerja SN. pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 mg/L Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 15 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$ dan 25 $\mu\text{g/mL}$ Sn.

A.7.2.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) ke dalam erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO_3 pekat, (Jangan tambahkan HNO_3 kedalam contoh jika tahapan dekstruksi tidak dapat diselesaikan pada hari yang sama).
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl_2 berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling;
- tambahkan 1,0 mL KCl , dinginkan pada temperatur ruang, tera dengan air suling, dan saring;

- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $N_2O-C_2H_2$;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi Sn ($\mu g/mL$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C),
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh.

A.7.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu g/mL$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.7.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.7.3 Merkuri (Hg)

A.7.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan $NaBH_4$ atau $SnCl_2$ dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm

A.7.3.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- b) *Microwave digester*;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- f) Tabung destruksi;
- g) Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- h) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- i) Gelas ukur 25 mL;
- j) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- k) Gelas piala 500 mL.

A.7.3.3 Bahan dan Pereaksi

- a) Larutan asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- b) Larutan asam nitrat, HNO_3 7 M;
- c) Campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- d) Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- e) Larutan natrium molibdat, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 %;
- f) Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL akuabides dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis.
- g) Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan akuabides dalam labu ukur 500 mL.
- h) Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL akuabides ke dalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian tambahkan 67 mL H_2SO_4 . Encerkan dengan akuabides sampai tanda garis dan kocok.
- i) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,135 4 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL akuabides dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan akuabides sampai tanda garis.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg; dan
pipet 1 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis, kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Hg; dan
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5 $\mu\text{g/mL}$; 0,005 $\mu\text{g/mL}$; 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Hg.
- l) Batu didih.

A.7.3.4 Cara kerja

A.7.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 batu didih sampai dengan 6 butir batu didih,
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit,
- c) tambahkan 20 mL campuran HNO_3 – HClO_4 (1:1) melalui pendingin,
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan,
- e) tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan,
- f) didihkan lagi selama 10 menit,
- g) matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang,
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V),
- i) pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis,

- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh,
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG,
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm,
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (mcg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y,
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C),
- o) lakukan pengerjaan duplo, dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.7.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO₃, 1 mL H₂O₂ kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.7.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.7.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

A.8 Cemaran arsen (As)

A.8.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

A.8.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Burner* atau *bunsen*;
- Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- Labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Cawan porselen 50 mL; dan
- Gelas piala 200 mL.

A.8.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- Asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- Ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 4 %;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan akuabides sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis.
- Larutan timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis.
- Larutan kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan akuabides;
- Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,320 3 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis.
- Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;

pipet 10 mL larutan baku As 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.

- m) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan baku As 100 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- n) Larutan baku kerja As.
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis kemudian kocok Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

A.8.4 Cara kerja

A.8.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (m) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan HClO_4 , tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.8.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, Uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu (450°C) (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;

- f) siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$; 0,05 $\mu\text{g/mL}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau *bunsen* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.8.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per miliiliter ($\mu\text{g/mL}$);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 fp adalah faktor pengenceran.

A.8.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.9 Cemarkan mikroba

A.9.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*

A.9.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.9.1.2 Peralatan

- a) Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- b) Otoklaf;
- c) Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- d) Pemanas listrik;
- e) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- f) Gelas piala steril;
- g) Labu Erlenmeyer steril;
- h) Botol pengencer steril;
- i) Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor*;

- j) Tabung reaksi; dan
- k) Sendok, gunting, dan spatula steril.

A.9.1.3 Larutan pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH_2PO_4 34 g
- Air suling 500 mL

Larutkan bahan-bahan di atas dan atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan aquabides. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer, 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 mL dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.9.1.4 Homogenisasi contoh

- a) Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.9.2 Angka lempeng total

A.9.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada suhu $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.9.2.2 Peralatan

- a) Inkubator $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- b) Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- c) Otoklaf;
- d) Penangas air bersirkulasi $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) *Tally register*;
- g) Botol pengencer 160 mL terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- h) Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* dan *pipettor*; dan
- i) Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril.

A.9.2.3 Pembenihan dan pengencer

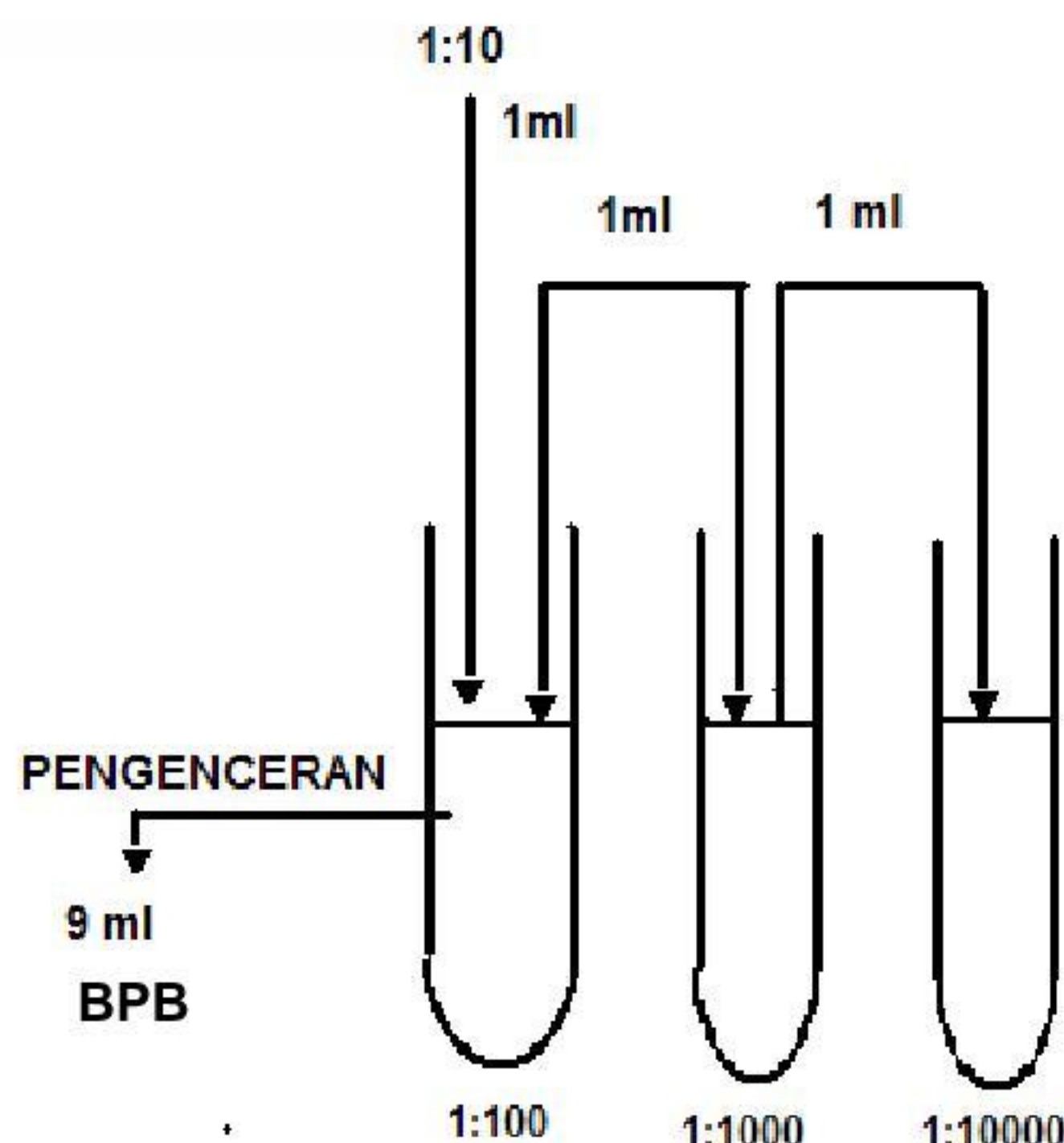
Plate count agar (PCA)

- *Tryptone* 5 g
- *Yeast extract* 2,5 g
- Glukosa 1 g
- Agar 15 g
- Air suling 1 000 mL

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit

A.9.2.4 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB);



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate Buffered Dilution Water* (BPB)

- b) pipet masing-masing 1 mL dari tingkat pengenceran (F) 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan petri steril secara duplo;
 c) tuangkan 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri;
 d) goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
 e) kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
 f) biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
 g) masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam inkubator pada suhu $30 ^\circ\text{C}$ selama (72 ± 2) jam; dan
 h) catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 72 jam.

A.9.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata – rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.9.2.6 Pernyataan hasil

A.9.2.6.1 Cara menghitung

- a) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- b) jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;

n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;

d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6.5 \times 10^6)$

$$\sim 6490 \quad 59 \quad > 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 \quad (5.9 \times 10^6)$$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni yang merambat.
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
 - perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
 - perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
 - perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.
 Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.9.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri):

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut:
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap.
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.9.3 *Escherichia coli*

A.9.3.1 Prinsip

Pertumbuhan *Escherichia coli* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.9.3.2 Peralatan

- a) Inkubator, $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$, terkalibrasi
- b) Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- c) Rak untuk tabung reaksi;
- d) Pipet Mohr 1 mL dan 10 mL berskala;
- e) Botol pengenceran (± 20 mL) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- f) Tabung reaksi;
- g) Tabung Durham;
- h) Cawan petri gelas ukuran 15 mm x 100 mm atau plastik ukuran 15 mm x 90 mm, steril; dan
- i) Jarum ose (inokulasi), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.9.3.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose* (LST) broth / *Lauryl tryptose* (LT) broth;
- b) *Brilliant green lactose bile* (BGLB) broth 2 %;
- c) *Escherichia coli* (EC) broth;
- d) *Levine's eosin methylene blue* (L-EMB) agar;

- e) *Plate count agar* (PCA);
- f) *Gram stain*;
- g) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- h) Pereaksi Kovacs';
- i) *Methyl red – voges proskauer* (MR – VP) *broth*;
- j) Pereaksi *Voges Proskauer*;
- k) Larutan *Methyl Red*;
- l) *Koser's Citrate Broth*;
- m) *Peptone diluents* 0.1 %;
- n) Pereaksi *indole*;
- o) Larutan kalium hidroksida 40 %;
- p) *Buffer fields phosfat buffered dilution water*;
- q) Larutan *alpha naphthol* 5%; dan
- r) Kristal kreatin.

A.9.3.4 Cara kerja

A.9.3.4.1 APM – Uji Pendugaan untuk *Escherichia coli*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.11.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate tryptose* (LST) *broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif untuk uji pendugaan.

A.9.3.4.2 APM – Uji penegasan untuk *Escherichia coli*

- a) Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung EC *broth* yang berlainan;
- b) inkubasikan tabung-tabung EC tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama (24 ± 2) jam pada suhu $(45,5 \pm 0,2)$ °C, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan "positif";
- c) apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- (48 ± 2) . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan "positif"; dan
- d) lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

A.9.3.4.3 Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- e) Kocok tabung-tabung EC *broth* yang positif secara hati-hati;
- f) ambil koloni sebesar satu mata Ose, kemudian digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimal 0,5 cm,
- g) inkubasikan piringan L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu (35 ± 1) °C;

- h) periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna hijau dengan atau tanpa kilat logam;
- i) dari tiap cawan L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang mencurigakan pada tabung agar miring PCA;
- j) inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu 35 °C dan gunakan untuk uji selanjutnya;
- k) buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E coli* adalah gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti dibawah ini serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST untuk menegaskan adanya produksi gas;
- uji indol
 - Inokulasi tabung *tryptone broth*,
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C,
 - uji terbentuknya indol dengan menambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi *Kovacs'*, dan
 - uji ini positif bila lapisan atas berwarna merah.
 - uji *Voges Proskauer*
 - Inokulasi tabung medium MR-VP dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C,
 - secara aseptis pindahkan 1 mL biakan tabung reaksi steril,
 - tambahkan 0,6 mL larutan 5 % *alpha naphthol* dalam alkohol, 0,2 mL larutan KOH 40 % dan beberapa butir kristal kreatin, dan
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - uji Merah metil
 - Setelah uji *Voges Proskauer*, inkubasikan kembali tabung MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
 - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung, dan
 - uji merah metil adalah positif bila terbentuk warna merah dan negatif bila terbentuk warna kuning.
 - penggunaan Sitrat
 - Inokulasi tabung *Koser's citrate broth* dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan media. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain,
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35 °C, dan
 - uji sitrat adalah positif bila terbentuk kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam tabung.
 - Uji pembentukan gas dari *Lactose*
 - Inokulasikan tabung LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, dan
 - periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

A.9.3.4.3.1 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.1 - Reaksi biokimia *E. coli* pada uji IMVIC

<i>Escherichia coli</i>	Indol	<i>Methyl Red</i>	<i>Voges Proskauer</i>	Sitrat
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- a) Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila :
- uji IMVIC mengikuti pola + + - - atau - + - - sesuai dengan Tabel A.1,
 - pewarnaan gram menunjukkan gram negatif bentuk batang tidak berspora; dan
 - terbentuknya gas dalam LST *broth* dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35°C
- b) Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung
- tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel A.2 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/mL contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	< 3,0	2	2	0	21
0	0	1	3,0	2	2	1	28
0	1	0	3,0	2	2	2	35
0	1	1	6,1	2	3	0	29
0	2	0	6,2	2	3	1	36
0	3	0	9,4	3	0	0	23
1	0	0	3,6	3	0	1	38
1	0	1	7,2	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7,4	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	9,2	3	2	2	210
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	> 1100

A.9.4 *Salmonella* sp.

A.9.4.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan ditegaskan melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

A.9.4.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 2) $^\circ\text{C}$;
- Inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator* (4 ± 2) $^\circ\text{C}$;
- Otoklaf;
- Oven;
- Neraca, kapasitas 2 000 g, dengan ketelitian 0,1 g;
- Neraca, kapasitas 120 g, dengan ketelitian 5 mg;
- Penangas air, (49 ± 1) $^\circ\text{C}$;

- h) Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- i) pH meter;
- j) Blender dan blender jar (botol) steril;
- k) Botol bertutup ulir bermulut lebar (500 mL) steril, labu *Erlenmeyer* 500 mL steril, *beaker*, 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) *Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- m) Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- n) Cawan petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastik;
- o) Pipet steril, 1mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 dan 10 mL dengan skala 0,1 mL;
- p) Jarum Ose (diameter ± 3 mm), terbuat dari *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) Jarum Ose yang berujung runcing;
- r) Tabung reaksi atau tabung biakan steril, 16 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- s) Botol pengencer 500 mL;
- t) Rak tabung reaksi atau rak tabung biakan;
- u) *Vortex mixer*;
- v) Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *Bunsen burner*;
- x) Kertas pH (kisaran pH 6 - 8) dengan ketelitian maksimal 0,4 unit pH per perubahan warna; dan
- y) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril.

A.9.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Lactose broth*;
- b) *Tetrathionate (TT) broth*;
- c) Media *Rappaport-Vassiliadis (RV)* (media RV harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi media RV tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- d) Agar *Xylose lysine desoxycholate (XLD)* (agar XLD);
- e) Agar *Hektoen enteric (HE)*;
- f) Agar *Bismuth sulfite (BS)*;
- g) Agar *Triple sugar iron (TSI)*;
- h) *Tryptone* (atau *tryptophane*) *broth (TB)*;
- i) *Trypticase soy-tryptose broth (TSTB)*;
- j) *Methyl red-Voges Proskeaur (MR-VP) broth*
- k) Agar *Simmons citrate*;
- l) *Urea broth*;
- m) *Rapid urea broth*;
- n) *Malonate broth*;
- o) *Lysine iron agar (LIA)* (Edward dan Fife)
- p) *Lysine decarboxylase broth (LDB)*;
- q) *Potassium cyanide (KCN) broth*;
- r) *Phenol red carbohydrate broth* (*Phenol red lactose broth* dan *Phenol red red sucrose broth*) atau *Purple carbohydrate broth* (*Purple lactose broth* dan *Purple sucrose broth*);
- s) *Phenol red dulcitol* atau *Purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*;
- t) Agar *MacConkey*;
- u) *Brain heart infusion (BHI) broth*;
- v) *Tryptose blood agar base*;
- w) Pereaksi Kovacs';
- x) Pereaksi uji Voges-Proskauer (VP);
- y) Kristal kreatin fosfat;

- z) Larutan potasium hidroksida (KOH), 40 %;
- aa) Larutan *bromocresol purple dye*, 0,2 %;
- bb) Indikator merah metil;
- cc) Indikator *phenol red* atau *bromocresol purple*;
- dd) Air suling steril;
- ee) Larutan *physiological saline*, 0,85 % (steril);
- ff) Larutan *formanilized physiological saline*;
- gg) *Formanilized antigen*;
- hh) Alfa naftol;
- ii) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*;
- gg) *Salmonella polyvalent flagellar (H) antiserum*;
- kk) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*; dan
- ll) *Salmonella somatic group (O) antisera*: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai.

A.9.4.4 Cara Kerja

A.9.4.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 225 mL *lactose broth* steril. Kocok selama 2 menit;
- b) pindahkan secara aseptik ke dalam botol pengencer 500 mL dan biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup. Kocok perlahan dan atur pH sampai $(6,8 \pm 0,2)$;
- c) tambahkan 0,45 mL larutan *briliant green dye* 1 %, kocok hingga tercampur merata; dan
- d) kendurkan tutup wadah secukupnya $1/4$ putaran. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada 35 °C.

A.9.4.4.2 Pengkayaan

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- b) pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan kedalam 10 mL media Rappaport-Vassiliadis (RV) dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL *tetrathionate (TT) broth* dan vorteks masing-masing campuran tersebut; dan
- c) inkubasikan media RV pada suhu $(42 \pm 0,2)$ °C selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi dan TT *broth* pada $(35 \pm 2,0)$ °C selama (24 ± 2) jam.

A.9.4.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose diameter 3 mm, goreskan biakan pengkayaan TT *broth* ke dalam cawan petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores;
- b) ulangi cara di atas dari media agar pengkayaan RV;
- c) inkubasikan cawan-cawan media agar BS, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi (24 ± 2) jam. Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi (24 ± 2) jam. Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
 XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam.
 Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam;

- HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
- BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- e) jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut;
 - f) dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena reaksi *Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, agar miring LIA harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu (5 - 8) °C;
 - g) inkubasi agar miring TSI dan LIA pada suhu 35 °C selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H₂S yang berlebihan. Pada TSI, biakan *Salmonella* sp. akan menghasilkan alkalin (merah) pada media agar miring dan asam (kuning) pada tusukan agar tegak, dengan atau tanpa memproduksi H₂S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA biakan *Salmonella* sp. Akan menghasilkan reaksi alkalin (ungu) pada tusukan pada tabung agar tegak. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan negatif. Umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk H₂S pada agar miring LIA. Beberapa biakan non *Salmonella* sp. membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
 - h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan dianggap sebagai *Salmonella* sp. dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang menghasilkan asam pada tusukan media agar tegak LIA dan alkalin pada agar miring serta reaksi asam pada tusukan pada media agar tegak TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella* sp. dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media agar tegak LIA dan asam pada agar miring TSI, serta reaksi asam pada tusukannya di media agar tegak TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp.. Bila biakan TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* sp. (alkalin pada bagian miring dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang diduga dari media selektif yang tidak memberikan biakan duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai pasal f di atas; dan
 - i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
 - tiga biakan presumtif TSI dari 1 set media agar selektif (HE, XLD dan BS) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga biakan presumtif yang diinokulasikan dari RV; dan
 - jika tiga biakan presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media agar selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 biakan TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

A.9.4.5 Identifikasi *Salmonella* sp.**A.9.4.5.1 Biakan campuran**

- a) Apabila biakan agar TSI terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media agar *MacConkey*, HE atau *XLD broth*. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C . Amati koloni yang diduga *Salmonella* sp., yaitu :
 - agar *Mac Conkey*. Koloni tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* sp. akan membentuk area yang terang pengendapan *bile* disebabkan oleh bakteri lain yang muncul atau tumbuh;
 - agar *hektoen enteric* (HE). Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam; dan
 - agar *xylose lysine desoxycholate* (XLD). Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media TSI dan LIA sesuai dengan A.11.4.4.3.f dan lanjutkan sesuai dengan A.11.4.4.3.g.

A.9.4.5.2 Biakan murni

- a) Uji urease (konvensional); dan
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose ke dalam tabung *urea broth*. Karena kadang-kadang tabung *urea broth* yang tidak diinokulasikan biakan akan berubah warna menjadi merah keunguan (uji positif) maka perlu dibuat tabung *urea broth* tanpa inokulasi sebagai kontrol. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan
- b) Uji urease (cepat).
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose berdiameter 3 mm ke dalam tabung *rapid urea Broth*. Inkubasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Biarkan *Salmonella* sp. akan memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna) pada uji urease, walaupun demikian perlu uji lebih lanjut.

A.9.4.5.3 Pengujian biakan urease negatif

- a) *Lysine decarboxylase* (LD) *broth*;
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 Ose koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari agar miring TSI dan inokulasikan ke dalam media LDA. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* sp. memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.
- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*; dan
inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah inkubasi 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung *Durham* dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *Tryptone (tryptophane) broth* (TB);
Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:
 - *Potassium cyanide* (KCN) *broth*

Pindahkan 1 Ose biakan dari TB 24 jam kedalam media KCN *broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan bila perlu dilapisi dengan parafin atau film. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella* sp. tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.

- *Malonate broth*

Pindahkan 1 mata Ose dari biakan TB kedalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.

- Uji indol

Dari media TB yang tersisa pindahkan 5 mL biakan ke dalam tabung reaksi steril, tambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs'. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan biakan sebagai bukan *Salmonella* sp. bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif;

A.9.4.5.4 Uji serologi *polyvalent flagellar* (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing agar TSI yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:
 - *BHI broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35°C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
 - *Trypticase soy tryptose* (TST) *broth* dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 mL larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 mL biakan di atas.
- b) siapkan 2 biakan dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan $\pm 0,5$ mL larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 mL antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 mL *formanilized physiological saline* dengan 0,5 mL *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48°C sampai dengan 50°C . Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam, sebagai berikut:
 - Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
 - negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
 - non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

A.9.4.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 mL 0,85% *saline* menggunakan jarum Ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;

- d) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) antiserum ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi uji *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan
 - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.9.4.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella* sp., biakan yang memberikan reaksi yang khas sesuai dengan Tabel A.3 butir 1-11. Jika 1 biakan TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella* sp., uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Biakan yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* sp. pada uji biokimia, harus dimurnikan sesuai dengan A.11.4.5.1 diatas dan uji kembali, sesuai dengan A.11.4.5.2 Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap biakan yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel A.3 :

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
 - inokulasi *broth* ini dengan biakan agar TSI miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam;
 - nyatakan positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung *Durham*. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
 - jika biakan memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp., kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;

Ikuti prosedur sesuai dengan A.9.4.5.6.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. pada biakan yang memberikan reaksi positif uji sukrosa, kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- c) *Methyl red-Voges-Proskauer* (MR-VP) *broth*; dan

Inokulasi media dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;

Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :

 - Pindahkan 1 mL MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - Tambahkan 0,6 mL alfa naftol dan aduk;
 - Tambahkan 0,2 mL larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
 - Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi VP negatif.

Uji merah metil (MR)

 - Tambahkan 5 tetes sampai dengan 6 tetes indikator merah metil ke dalam 5 mL media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam;
 - amati hasilnya dengan segera; dan
 - umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif.

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.

d) *Agar Simmons citrate*.

- Inokulasi media dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari agar miring TSI, dengan cara menggores agar miring dan menusuk bagian tegak. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil sitrat positif; dan
- negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

A.9.4.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* sp. biakan-biakan yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel A.3. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan-biakan yang memberikan reaksi seperti pada Tabel A.4. Bila tidak ada 1 biakan TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* sp. pada uji biokimia, lakukan uji biokimia sesuai dengan A.11.4.5.3 terhadap biakan yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp.

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
1.	<i>Glucose</i> (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	<i>Lysine decarboxylase</i> (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H_2S (TSI dan LIA)	Hitam	tidak hitam	+
4.	<i>Urease</i>	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	<i>Lysine decarboxy broth</i>	warna ungu	warna kuning	+
6.	<i>Phenol red dulcitol broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7.	KCN broth	Pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8.	<i>Malonate broth</i>	warna biru	tidak berubah warna	- ^c
9.	Uji indol	permukaan bewarna nila	permukaan bewarna kuning	-
10.	Uji polyvalent flagellar	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11.	Uji polyvalent somatic	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12.	<i>Phenol red lactose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	Uji Voges-Proskauer	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-
15.	Uji methyl red	merah menyebar	Kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V

Keterangan:

^a+ adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari;

- adalah 90% atau lebih negatif dalam satu atau dua hari;

V adalah variabel;

^b adalah mayoritas dari biakan *Salmonella arizonae*: negatif; dan

^c adalah mayoritas dari biakan *Salmonella arizonae*: positif.

Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella* sp.

No	substrat uji	Hasil
1	<i>Urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	Uji <i>indol</i> dan <i>polivalent flagellar</i> (H) atau uji <i>indol</i> dan uji Spicer Edwards <i>flagellar</i>	positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan) positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase</i> dan <i>KCN broth</i>	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^{a,b}
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^b
6	<i>KCN broth</i> , uji <i>Voges-Proskauer</i> , dan <i>methyl red</i>	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
Keterangan: ^a adalah uji <i>malonate broth</i> lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan <i>Salmonella arizonae</i> ^b adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> sp., uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella</i> sp..		

A.9.5 Kapang dan khamir

A.9.5.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dan khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ selama 5 hari.

A.9.5.2 Peralatan

- Inkubator $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- pH meter;
- Alat penghitung koloni;
- Tally register*;
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL, steril;
- Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- Bent glass rod*.

A.9.5.3 Pembenihan, pengencer dan pereaksi

- Agar *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC);
- Agar *dichloran 18 % glycerol* (DG 18);
- Larutan pepton 0,1 %, dan
 - pepton 1 g
 - Air suling 1000 mL
 Larutkan pepton dalam air suling kemudian sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan atur pH sehingga mencapai pH akhir $(7,0 \pm 0,2)$.
- Larutan antibiotik:
Antibiotik ditambahkan dalam media kapang dan khamir untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil selama proses dalam otoklaf. Konsentrasi antibiotik yang dianjurkan adalah 100 mg/L media. Jika terlihat pertumbuhan bakteri yang berlebihan, siapkan media dengan penambahan

chloramphenicol 50 mg/L sebelum otoklaf dan *chlortetracycline* 50 mg/L steril saat media mulai dikondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

A.9.5.4 Persiapan dan Homogenisasi Contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pepton 0,1% steril sehingga diperoleh pengenceran 1 : 10; dan
- Kocok campuran beberapa kali hingga homogen

A.9.5.5 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} dengan menggunakan larutan pepton 0,1%
- persiapan media dalam cawan dilakukan dengan metode metode tuang (media DG 18):
 - pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media;
 - campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam selama 1 menit sampai dengan 2 menit; dan
 - biarkan hingga campuran dalam cawan petri memadat.
- masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;
- hitung koloni pada cawan setelah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu selama 48 jam. Jangan menghitung koloni dalam cawan sampai batas waktu inkubasi berakhir, karena merubah posisi cawan dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder spora; dan
- nyatakan hasil perhitungan sebagai koloni per gram contoh.

A.9.5.6 Pernyataan hasil

A.9.5.6.1 Cara menghitung

Hitung koloni kapang dan khamir untuk cawan yang berisi 10 koloni sampai dengan 150 koloni.

A.9.5.6.2 Cara membulatkan angka

Cara membulatkan angka pada hasil perhitungan kapang dan khamir sesuai dengan A.9.2.6.2.

Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemists 2005. AOAC. *Official Method 970.20, Cacao Products, Preparation of Laboratory Samples*, 18th Edition, Chapter 31.1.01
- Association of Official Analytical Chemists 2005. AOAC. *Official Method 963.15, Fat in Cacao Products: Soxhlet Extraction Method*, 18th Edition, Chapter 31.4.02,
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. AOAC *Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. AOAC *Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods: Atomic Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18th Edition, Chapter 9.1.09..
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. AOAC *Official Method 971.21, Mercury in Foods, Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemists 2005. AOAC. *Official Method 931.04, Moisture in Cacao Products, Gravimetric Method*. 18th Edition,. Chapter 31.1.02.
- Association of Official Analytical Chemists 2005. AOAC. *Official Method 970.23, Stone Cell and Group Count of Cacao Products*. 18th Edition, Chapter 31.2.05
- Association of Official Analytical Chemists 2005. AOAC. *Official Method 985.61, Tin in Canned Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.35
- Codex Alimentarius Commission.2001. *Codex Standard for Cocoa Powders (Cocoas) and Dry Mixtures of Cocoa and Sugars*, Codex Stan 105-1981, Rev. I-2001.
- E.H. Meursing. *Cocoa Powders for industrial processing*, second, revised edition
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Mold, Yeast and Mycotoxin*. Chapter 18.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2007. *Salmonella sp.* Chapter 5.
- E. H. Meursing, 1976. *Determination of Fineness in Cocoa Powders For Industrial Processing*, 2nd Edition.
- SNI 2323:2008, *Biji kakao*
- SNI 3749:2009, *Kakao massa*
- SNI 7553:2009, *Bungkil kakao*
- SNI 7387: 2009, *Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan.*
- SNI 7388 : 2009, *Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.*